

# Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/001084

International filing date: 03 February 2005 (03.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP  
Number: PCT/EP2004/001031  
Filing date: 04 February 2004 (04.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 04 July 2005 (04.07.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland  
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**Bescheinigung**

**Certificate**

**Attestation**

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten internationalen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the international patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet international spécifiée à la page suivante.

Den Haag, den  
The Hague,  
La Haye, le

Der Präsident des Europäischen Patentamts  
Im Auftrag  
For the President of the European Patent Office  
Le Président de l'Office européen des brevets  
p.o.

G. Koestel

Patentanmeldung Nr.  
Patent application no.  
Demande de brevet n°

PCT/EP 04/001031

**Blatt 2 der Bescheinigung**  
**Sheet 2 of the certificate**  
**Page 2 de l'attestation**

---

**Anmeldung Nr.:** PCT/EP 04/001031  
**Application no.:**  
**Demande n°:**

**Anmelder:** 1. Evotec Technologies GmbH - Düsseldorf, Deutschland  
**Applicant(s):** 2. MÜLLER, Torsten - Berlin, Deutschland (nur US)  
**Demandeur(s):** 3. HUMMEL, Stefan - Haseldorf, Deutschland (nur US)

**Bezeichnung der Erfindung:**

**Title of the invention:**

**Titre de l'invention:**

Mehrparametrische Detektion in einem fluidischen Mikrosystem

**Anmeldetag:**

**Date of filing:**

**Date de dépôt:**

04. Februar 2004 (04.02.2004)

**In Anspruch genommene Priorität(en)**

**Priority(ies) claimed**

**Priorité(s) revendiquée(s)**

**Staat:**

**State:**

**Pays:** Deutschland

**Tag:**

**Date:**

**Date:**

05. Februar 2003  
(05.02.2003)

**Aktenzeichen:**

**File no.**

**Numéro de dépôt:** 103 04 653.4

**Bemerkungen:**

**Remarks:**

**Remarques:**

Weitere Anmelder:

4. PFENNIG, Annette - Berlin, Deutschland (nur US)
5. GRADL, Gabriele - Berlin, Deutschland (nur US)
6. BONSEN, Axel - Hamburg, Deutschland (nur US)
7. SCHNELLE, Thomas - Berlin, Deutschland (nur US)
8. MEYER, Rüdiger - Hamburg, Deutschland (nur US)

Weitere Prioritätsansprüche:

Deutschland

09. Mai 2003  
(09.05.2003)

103 20 956.5

15911/PCT

Mehrparametrige Detektion in einem fluidischen Mikrosystem

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Messung von Eigenschaften von Partikeln, die sich in einer Flüssigkeit suspendiert durch ein fluidisches Mikrosystem bewegen, und Messeinrichtungen und fluidische Mikrosysteme, die zur Durchführung derartiger Verfahren eingerichtet sind.

Es ist allgemein bekannt, mikroskopisch kleine Objekte, insbesondere biologische Zellen durch optische Messverfahren zu charakterisieren, die auf der Detektion von Fluoreszenzlicht oder auf Streulicht- oder Durchlichtmessungen (z.B. Phasenkontrastmessungen) basieren. In der Regel sind zur Charakterisierung von Zellen mehrparametrige Analysen erforderlich, bei denen zum Beispiel morphologische Eigenschaften und stoffliche Eigenschaften der Zellen erfasst werden.

Bei der herkömmlichen Durchflußzytometrie werden in sog. Flowcytometern Zellen hydrodynamisch fokussiert, in Tropfen vereinzelt und bei der Passage an einem Detektor durch gleichzeitige (zeitlich parallele) Aufnahme von Fluoreszenz- und Streulichtsignalen charakterisiert. Flowcytometer besitzen zwar wegen der hohen Tropfengeschwindigkeiten von zum Beispiel 10 m/s einen hohen Durchsatz. Nachteilig ist jedoch die hohe hydrodynamische Belastung der Zellen, so dass die Zellvitalität stark eingeschränkt ist. Weitere Nachteile der Flowcytometer bestehen darin, dass kein steriles Arbeiten möglich ist und dass kompliziertere Messungen, wie zum Beispiel Kinetik-Messungen oder morphologische Untersuchungen, insbesondere von Zellbestandteilen nur schwer möglich oder ausgeschlossen sind.

Es ist ferner allgemein bekannt, in fluidischen Mikrosystemen suspendierte Partikel, insbesondere biologische Zellen im sus-

pendierten Zustand zu untersuchen. Es ist beispielsweise in einem Hybridchip eine Einzellzellanalyse vorgesehen, bei der Zellen mit dielektrischen Elementen unter der Wirkung von negativer Dielektrophorese manipuliert und an einer Messstation hochaufgelösten mikroskopischen Untersuchungsverfahren unterzogen werden (siehe z. B. T. Müller et al. in "Biosensors & Bioelectronics" Bd. 14, 1999, S. 247-256). Um Zellen zunächst im Suspensionsstrom in einem Kanal des Mikrosystems zu fokussieren, werden dielektrische Aufreihenelemente (sog. Funnel) verwendet. Anschließend werden die Zellen in einem dielektrischen Feldkäfig für eine bestimmte Detektionszeit bei sehr geringer Strömungsgeschwindigkeit ( $< 50 \mu\text{m/s}$ ) für eine Fluoreszenzmessung stabil festgehalten. Die Messung von Partikeleigenschaften in fluidischen Mikrosystemen besitzt zwar Vorteile in Bezug auf die hohe Spezifität und das hohe Auflösungsvermögen der Messungen, die Möglichkeit, steril zu arbeiten, und die partikelspezifische Prozedur nach der Messung, zum Beispiel bei der Ablage von Zellen in Kulturgefäßen. Nachteilig ist jedoch der insbesondere im Vergleich zur Durchflußzytometrie erheblich geringere Durchsatz der fluidischen Mikrosysteme.

Es sind Versuche bekannt, den Durchsatz der fluidischen Mikrosysteme durch automatische Detektionstechniken zu erhöhen, indem insbesondere der Bewegungszustand der Zellen unter Verwendung einer Detektormaskierung erfasst wird (siehe DE 199 03 001, DE 101 20 498). Allerdings ist auch bei diesen Techniken erforderlich, die Güte der Objekte, also beispielsweise die Eignung biologischer Zellen für nachfolgende Verarbeitungs- oder Kultivierungsschritte, visuell durch einen Operator zu evaluieren. Der Operator entscheidet unter Beobachtung eines mit dem Mikroskop vergrößerten Bildes, welche Objekte für eine hochauflösende Messung oder für weitere Schritte selektiert werden. Diese Evaluierung erfordert einen speziell geschulten Operator, sie ist zeitaufwendig, ermüdend und wegen der Subjektivität der Entscheidung nachteilig. Beispielsweise werden

schwach fluoreszierende Objekte von einem Operator ggf. nicht erkannt. Unterscheidungshilfen können nur durch eine zusätzliche, ggf. belastende Beleuchtung der Zellen gegeben werden.

Die Aufgabe der Erfindung ist es, verbesserte Verfahren zur Messung von Eigenschaften von Partikeln in fluidischen Mikrosystemen bereitzustellen, mit denen die Nachteile der herkömmlichen Messverfahren überwunden werden und die insbesondere einen erhöhten Durchsatz und eine Automatisierung der Messung ermöglichen. Die Aufgabe der Erfindung ist es auch, verbesserte Messeinrichtungen und/oder fluidische Mikrosysteme zur Umsetzung der Messverfahren bereitzustellen.

Diese Aufgaben werden mit Verfahren, Messeinrichtungen und Mikrosysteme mit den Merkmalen gemäß den Patentansprüchen 1, 18 oder 22 gelöst. Vorteilhafte Ausführungsformen und Anwendungen der Erfindung ergeben sich aus den abhängigen Ansprüchen.

Eine Grundidee der Erfindung ist es, ein Verfahren zur Messung von Eigenschaften von Partikeln, die sich in einer Flüssigkeit suspendiert durch ein fluidisches Mikrosystem bewegen, mit mindestens zwei zeitlich und räumlich versetzten Messungen an einem bestimmten Partikel und einer anschließenden gemeinsamen, korrelierten Evaluierung der Messergebnisse dahingehend weiterzuentwickeln, dass die Messergebnisse für verschiedene Eigenschaften des gemessenen Partikels charakteristisch sind, und die Evaluierung einen Vergleich beider Messergebnisse mit vorbestimmten Erwartungswerten umfasst, um in Abhängigkeit vom Ergebnis des Vergleiches weitere Messungen oder Manipulationen am gemessenen Partikel zu bewirken. Besonders vorteilhaft kann es sein, aufeinander folgend einen morphologischen (z.B. geometrischen) und einen stofflichen Parameter des betrachteten Partikels zu erfassen. Eine solche Kombination ermöglicht eine Klassifizierung des Partikels mit erhöhter Sicherheit und Reproduzierbarkeit und eine zuverlässigere Ansteuerung von Folgepro-

zessen, wie zum Beispiel einer ergänzenden Präzisionsmessung oder einer Sortierung.

Durch die erfindungsgemäße Kombination von mindestens zwei räumlich getrennt und in einem gemeinsamen, durchströmten Kanal angeordneten Messstationen zur Durchführung der auf verschiedene Parameter (Eigenschaften) des Partikels gerichteten, korreliert ausgewerteten Messungen können vorteilhafterweise die Nachteile der herkömmlichen Messung in fluidischen Mikrosystemen überwunden werden. Der Durchsatz kann erhöht werden, indem die Messungen schneller bei laufender Strömung erfolgen. Während ein Partikel vollständig vermessen ist und die zu diesem Partikel ermittelten Parameter evaluiert werden, kann bereits der nächste, in der Strömung durch das Mikrosystem folgende Partikel der ersten Messung unterzogen werden. Durch die räumliche Trennung der Messstationen können gegenseitige Störungen der Detektionsvorgänge zum Beispiel durch unerwünschtes Streulicht vermieden werden. Die Störfreiheit ermöglicht eine reproduzierbare und objektivierbare Messung unabhängig von einem Operator und damit eine Automatisierung der Messung. Schließlich werden im Vergleich zu Messungen in Flowcytometern unerwünschte Belastungen der Partikel durch mechanische oder hydrodynamische Kräfte vermieden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird bei einer ersten Messung ein morphologischer Parameter des Partikels ermittelt. Morphologische Parameter oder geometrische Eigenschaften umfassen allgemein Informationen über die Gestalt, Form oder Struktur des Partikels oder über die Lageverhältnisse von Bestandteilen des Partikels. Aus dem morphologischen Parameter kann vorteilhafterweise festgestellt werden, ob der Partikel nach den Messungen überhaupt weiteren Verarbeitungsschritten unterzogen werden soll. Die erste Messung umfasst vorzugsweise eine Durchlichtmessung oder eine Impedanzmessung. Diese Messungen können Vorteile in Bezug auf eine schnelle und

genaue Erfassung des morphologischen Parameters besitzen. Außerdem kann festgestellt werden, ob Partikel einzeln oder zu Aggregaten verbunden vorliegen. Letzteres wäre beispielsweise bei Klonierungsexperimenten unerwünscht. Im Rahmen der ersten Messung kann jedoch auch eine elektrische oder magnetische Messung erfolgen.

Gemäß einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird bei einer zweiten Messung ein stofflicher Parameter des Partikels ermittelt, der für die chemische Zusammensetzung des Partikels charakteristisch ist. Stoffliche Parameter oder Eigenschaften umfassen also allgemein Informationen über die chemische Zusammensetzung des Partikels oder seiner Bestandteile. Bei biologischen Anwendungen kann vorteilhafterweise festgestellt werden, ob der Partikel, z. B. eine Zelle bestimmte Stoffwechselprodukte oder genetisch generierte Substanzen enthält. Die zweite Messung umfasst vorzugsweise eine Fluoreszenzmessung, die Vorteile in Bezug auf eine hohe Spezifität der detektierten Substanzen im Partikel besitzen kann. Im Rahmen der zweiten Messung kann jedoch auch eine elektrische Messung (z.B. Impedanzmessung) oder eine magnetische Messung erfolgen.

Besonders vorteilhaft ist es, wenn die erste Messung zeitlich vor der zweiten Messung durchgeführt wird. Der morphologische Parameter wird zeitlich vor dem stofflichen Parameter gemessen. Bei dieser Ausführungsform können die Messbedingungen der zweiten Messung vorteilhafterweise an die morphologischen Eigenschaften des betrachteten Partikels angepasst werden. Beispielsweise kann bei einem großen Partikel wegen eines erwarteten hohen Fluoreszenzsignals eine relativ geringe Intensität der Fluoreszenzanregung eingestellt werden.

Alternativ ist es erfindungsgemäß möglich, dass die zweite Messung zeitlich vor der ersten Messung durchgeführt wird. Wenn in diesem Fall der stoffliche Parameter zeitlich vor dem morpholo-



gischen Parameter gemessen wird, können sich Vorteile in Bezug auf den Durchsatz der Messungen ergeben.

Das erfindungsgemäße Verfahren kann mit verschiedenen Partikelarten, insbesondere synthetischen oder biologischen Partikeln durchgeführt werden. Besondere Vorteile ergeben sich aus den schonenden Messbedingungen, wenn die Partikel biologische Materialien, also beispielsweise biologische Zellen, Zellgruppen, Zellbestandteile oder biologisch relevante Makromoleküle, jeweils ggf. im Verbund mit anderen biologischen Partikeln oder synthetischen Trägerpartikeln umfassen. Synthetische Partikel können feste Partikel, flüssige, vom Suspensionsmedium abgegrenzte Teilchen oder Mehrphasenpartikel umfassen, die gegenüber dem Suspensionsmedium im Kanal eine getrennte Phase bilden.

Gemäß einer bevorzugten Anwendung der Erfindung werden in Abhängigkeit vom Ergebnis des Vergleiches der Messergebnisse Manipulationselemente, insbesondere dielektrische und/oder optische Elemente im Mikrosystem betätigt, um den betrachteten Partikel einer weiteren Messung und/oder Umlenkung in einen bestimmten Bereich oder Ausgang des Mikrosystems zu unterziehen. Als dielektrische oder optische Elemente, die relativ zu den Messstationen stromabwärts angeordnet sind, werden vorzugsweise mindestens ein dielektrischer Käfig, mindestens eine dielektrische Weiche und/oder mindestens ein optischer Manipulator verwendet. Bei den Manipulationselementen kann es sich jedoch auch um einen Porator oder allgemein um fluidische Komponenten handeln, wie beispielsweise eine Partikeldepositionseinheit.

Besondere Vorteile können sich in Bezug auf die Messgenauigkeit ergeben, wenn die im Ergebnis des Vergleiches durchgeführte mindestens eine weitere Messung eine Messung am ruhenden, in der Flüssigkeit zum Beispiel mit einem dielektrischen Feldkäfig festgehaltenen Partikel, umfasst.

Wenn gemäß einer Variante der Erfindung aus den gemessenen Parametern der Partikel die Zeit, die Richtung und/oder die Geschwindigkeit des Vorbeitritts des gemessenen Partikels an den Messstationen ausgewertet werden, können die nachgeordneten Manipulationselemente mit größerer Zuverlässigkeit zu den Zeiten angesteuert werden, wenn der betrachtete Partikel mit der Strömung an diesen Elementen ankommt. Diese Verfolgung der Partikelbewegung wird auch als "Cell Tracking" bezeichnet und kann auch zwischen den Messstationen erfolgen. Das "Cell Tracking" kann also innerhalb des gesamten Kanals des Mikrosystems erfolgen.

Besonders vorteilhaft ist es für den Partikeldurchsatz, dass mit dem erfindungsgemäßen Verfahren eine Vielzahl von Partikeln aufeinanderfolgend an den Messstationen vorbeigeströmt, gemessen und einzeln evaluiert und weiter verarbeitet werden können. Als Messgrößen kommen hierbei unter anderem die Zellgeschwindigkeit bzw. die Bewegungsgeschwindigkeit der Partikel, der Partikel- bzw. Zellabstand oder der Strömungszustand in Frage.

Weitere Gegenstände der Erfindung sind eine Messeinrichtung, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahren angepasst ist, und ein fluidisches Mikrosystem, das mit einer derartigen Messeinrichtung ausgestattet oder verbunden ist.

Die erfindungsgemäße Messeinrichtung zeichnet sich insbesondere durch mindestens zwei Messstationen zur Messung von Partikelparametern, die für verschiedene Eigenschaften des jeweiligen Partikels charakteristisch sind, und eine Auswertungseinrichtung mit einer Vergleicheinrichtung zum Vergleich der Parameter mit vorbestimmten Erwartungswerten aus, mit der in Abhängigkeit vom Ergebnis des Vergleiches ein Signal für weitere Messungen oder Manipulationen am Partikel erzeugt werden kann.

Die Messstationen können allgemein für optische oder elektrische Messungen eingerichtet sein. Beispielsweise umfasst die erste Messstation vorzugsweise einen Durchlichtdetektor oder einen Impedanzdetektor, der mit einem Fluoreszenzdetektor als zweiter Messstation kombiniert ist.

Wenn das erfindungsgemäße Mikrosystem die Messeinrichtung als Systemkomponente enthält, können sich Vorteile in Bezug auf die Kompaktheit des Aufbaus ergeben. Alternativ kann die Messeinrichtung als externes Gerät, zum Beispiel mit einem Mikroskop-aufbau vorgesehen sein.

Vorteile für die Messzuverlässigkeit und -effektivität können sich ergeben, wenn das Mikrosystem stromaufwärts vor der Anordnung der Messstationen mit Fokussierelektroden zur Aufreihung von strömenden, suspendierten Partikeln entlang einer geraden Reihe parallel zur Strömungsrichtung ausgestattet ist. Die Reihe ist auf die Messstationen gerichtet, so dass für alle Partikel die Messungen unter im wesentlichen identischen geometrischen Verhältnissen erfolgen.

Wenn gemäß einer weiteren Variante der Erfindung das Mikrosystem stromabwärts nach der Anordnung der Messstationen mit weiteren Messstationen, zum Beispiel mindestens einem dielektrischen Käfig, mindestens einer dielektrischen Weiche und/oder mindestens einem optischen und/oder magnetischen Manipulator ausgestattet ist, können sich besondere Vorteile in Bezug auf die unmittelbare Auswirkung der Evaluierungsergebnisse auf die weitere Verarbeitung der Partikel ergeben. Es kann insbesondere vorgesehen sein, dass die Vergleichereinrichtung unmittelbar mit den weiteren Messstationen, dem dielektrischen Käfig, der dielektrischen Weiche und/oder dem optischen Manipulator verbunden ist, um diese mit dem Signal der Vergleichereinrichtung zu betätigen.

In einem Ausführungsbeispiel der Erfindung verzweigt der Trägerstromkanal in mindestens zwei Ausgangsleitungen, wobei eine der beiden Ausgangsleitungen zur Abführung von negativ selektierten Partikeln dient, wohingegen die andere Ausgangsleitung zur Weiterführung von positiv selektierten Partikeln dient. Es ist jedoch auch möglich, mehr als zwei Ausgangsleitungen vorzusehen, um die einzelnen Partikel unterschiedlichen Klassen zuzuordnen zu können, die anschließend eine unterschiedliche Behandlung erfahren.

In einem Ausführungsbeispiel der Erfindung werden die in dem Trägerstromkanal suspendierten Partikel außermittig fokussiert, wozu vorzugsweise eine außermittig angeordnete Fokussiereinrichtung vorgesehen ist. Dies ist vorteilhaft, da die in dem Trägerstromkanal suspendierten und durch die Fokussiereinrichtung außermittig fokussierten Partikel dann automatisch und exakt definiert in eine bestimmte Ausgangsleitung gelangen, wenn keine aktive Ansteuerung einer im Bereich der Verzweigungsstelle angeordneten Weiche bzw. eines Schalters erfolgt.

Hierbei besteht zum einen die Möglichkeit, dass die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel auf der Ausgangsleitung für die negativ selektierten Partikel außermittig fokussiert werden. Dies hat zur Folge, dass die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel ohne eine aktive Ansteuerung der Weiche bzw. des Schalters automatisch in die Ausgangsleitung für die negativ selektierten Partikel gelangen, wohingegen die Weiche bzw. der Schalter aktiv angesteuert werden muss, um die Partikel in die Ausgangsleitung für die positiv selektierten Partikel zu befördern. Diese Anordnung eignet sich deshalb besonders bei Untersuchungen, bei denen nur wenige Partikel positiv selektiert werden.

Es besteht jedoch alternativ auch die Möglichkeit, dass die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel auf der Seite der Aus-

gangsleitung für die positiv selektierten Partikel außermittig fokussiert werden, wenn beispielsweise die Fokussiereinrichtung auf dieser Seite außermittig angeordnet ist. Dies hat zur Folge, dass die in den Trägerstrom suspendierten Partikel ohne eine aktive Ansteuerung der Weiche bzw. des Schalters automatisch in die Ausgangsleitung für die positiv selektierten Partikel gelangen, wohingegen eine aktive Ansteuerung der Weiche bzw. des Schalters erforderlich ist, um die Partikel in die Ausgangsleitung für die negativ selektierten Partikel zu befördern. Diese Anordnung eignet sich deshalb besonders für Untersuchungen, bei denen ein großer Prozentsatz der Partikel positiv selektiert wird.

In einem bevorzugten Ausführungsbeispiel der Erfindung ist ferner vorgesehen, dass der elektrische Käfig zwei Funktionen erfüllt, nämlich zum einen die Fixierung der in dem Trägerstrom suspendierten Partikel und zum anderen die Funktion einer Weiche bzw. eines Schalters, um die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel einer von mehreren Ausgangsleitungen zuzuführen. Hierzu ist der Feldkäfig im Bereich der Verzweigungsstelle der Ausgangsleitungen angeordnet.

Der im Rahmen der vorliegenden Beschreibung verwendete Begriff einer Verzweigungsstelle ist allgemein zu verstehen und nicht auf den geometrischen Schnittpunkt der Ausgangsleitungen beschränkt. Es ist vielmehr auch möglich, dass der Käfig bzw. die Weiche stromaufwärts vor dem Schnittpunkt der Ausgangsleitungen angeordnet ist. Beispielsweise umfasst der Begriff einer Verzweigungsstelle auch den sogenannten "Separatrix". Dabei handelt es sich um die Trennungslinie der laminaren Strömung in dem Trägerstromkanal.

Ferner ist zu erwähnen, dass in mindestens einer der Ausgangsleitungen eine Fokussiereinrichtung angeordnet sein kann, um ein Absinken der Partikel in den Ausgangsleitungen zu verhin-

dern. Dies ist vorteilhaft, da die Strömungsgeschwindigkeit in den Ausgangsleitungen vom Mittelpunkt der Ausgangsleitungen zu den Wandungen hin abnimmt, so dass sich die suspendierten Partikel bei einem Absinken in den Ausgangsleitungen wandnah ablagern könnten, was durch die Fokussiereinrichtung verhindert wird.

In einem weiteren Ausführungsbeispiel wird der Trägerstromkanal aus mindestens zwei Eingangsleitungen gespeist, die jeweils einen Trägerstrom mit suspendierten Partikeln zuführen.

Die beiden Teilströme mit den suspendierten Partikeln können hierbei in dem stromaufwärts gelegenen Bereich des Trägerstromkanals zunächst durch eine Trennwand voneinander getrennt und/oder getrennt voneinander durch jeweils eine Messstation untersucht werden.

In Abhängigkeit von dem Ergebnis dieser Untersuchung der einzelnen Teilströme können die Partikel der einzelnen Teilströme dann zusammengeführt oder abgeleitet werden.

Weitere Einzelheiten und Vorteile der Erfindung werden aus der folgenden Beschreibung der beigefügten Zeichnungen ersichtlich. Es zeigen:

Figuren 1 bis 4: Ausschnitte erfindungsgemäßer fluidischer Mikrosysteme mit verschiedenen Ausführungsformen von Messeinrichtungen,

Figuren 5 bis 13: Alternative Ausführungsbeispiele.

Die Figuren 1 bis 4 illustrieren verschiedene Ausführungsformen erfindungsgemäßer fluidischer Mikrosysteme in schematischer Teilansicht. Fluidische Mikrosysteme, insbesondere zur Manipulation biologischer Zellen sind an sich bekannt und werden da-

her mit weiteren Einzelheiten hier nicht beschrieben. Im folgenden wird die Erfindung unter Bezug auf die Messung und Manipulation von biologischen Zellen erläutert, ohne auf dieses Ausführungsbeispiel beschränkt zu sein.

Figur 1 zeigt einen Kanal 30 (oder ein Kompartiment) des Mikrosystems 100 in schematischer Draufsicht. Der Kanal 30 wird durch die Seitenwände 31, 32, einen Boden 33 und eine Deckfläche (nicht dargestellt) begrenzt. Der Abstand zwischen den Seitenflächen 31, 32 liegt vorzugsweise im Bereich von 50  $\mu\text{m}$  bis 5 mm, insbesondere im Bereich von 100  $\mu\text{m}$  bis 1 mm, und speziell im Bereich von 200 bis 800  $\mu\text{m}$  (Breite des Kanals), während der Abstand zwischen dem Boden 33 und der Deckfläche vorzugsweise rund 5  $\mu\text{m}$  bis 200  $\mu\text{m}$ , z. B. 20 bis 100  $\mu\text{m}$  beträgt (Höhe des Kanals). Das Mikrosystem 100 besteht vorzugsweise aus einem transparenten Material, zum Beispiel Glas oder Kunststoff, wobei mindestens im Bereich der Messstationen in Detektionsrichtung Wände mit optischer Qualität (wie zum Beispiel von Mikroskop-Deckgläsern) verwendet werden. Der Kanal 30 wird von einer Flüssigkeitsströmung in Pfeilrichtung durchströmt. Die Flüssigkeitsströmung ist typischerweise eine laminare Strömung mit einer Strömungsgeschwindigkeit im Bereich von z. B. 20  $\mu\text{m/s}$  bis 20 mm/s. In der Flüssigkeitsströmung sind Zellen 20, 21, 22 ... suspendiert, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren detektiert werden sollen. Die Zellen bewegen sich in Strömungsrichtung mit der gleichen Geschwindigkeit wie die Flüssigkeit.

Im Kanal 30 ist eine erfindungsgemäße Messeinrichtung 10 vorgesehen, die allgemein zwei schematisch illustrierte Messstationen 11, 12 umfasst. Die allgemein für optische Messungen eingerichteten Messstationen sind aufgebaut, wie es an sich für Streulicht-, Durchlicht-, Phasenkontrast- oder Fluoreszenzmessungen bekannt ist. Sie umfassen eine Beleuchtungseinrichtung und eine Detektoreinrichtung (nicht mit Einzelheiten dargestellt). Die Beleuchtungseinrichtung dient je nach der Messauf-

gabe einer reinen Beleuchtung oder einer Anregung von Fluoreszenzlicht und umfasst zum Beispiel eine Laserlichtquelle. Jede Detektoreinrichtung ist zur Detektion des von einer Zelle durchgelassenen, abgeschatteten, gestreuten oder emittierten Lichtes eingerichtet und umfasst je nach der Messaufgabe ein oder mehrere lichtempfindliche Elemente, z. B. Photodioden oder CCD-Zeilen oder -Arrays. Die Detektion kann direkt oder nach optischer Vergrößerung mit einem Mikroskop von der Deck- oder Bodenfläche her vorgesehen sein.

Die Beleuchtungseinrichtung kann für eine lokale Fluoreszenzanregung ausgelegt sein. Damit können die Vorteile verbunden sein, dass im Falle einer lokalen Anregung keine Interferenz mit der ersten optischen Detektion (Phasenkontrast) auftritt, sich mehrere lokale Anregungssspots realisieren lassen und die Zellbelastung reduziert ist. Diese Vorteile wurden mit herkömmlichen Detektionstechniken nicht erzielt.

Zur Verminderung von störendem Streulicht, das von der Beleuchtungseinrichtung für die Durchlichtmessung (11) oder als rückreflektiertes Fluoreszenzanregungslicht auf die Detektoreinrichtung für die Fluoreszenzmessung (12) fallen könnte, kann das Mikrosystem 100 auf der Deck- oder Bodenfläche mit einer abschirmenden Streulicht-Maske (gestrichelt eingezeichnet) ausgestattet sein. Die Maske ist entgegengesetzt zur Fluoreszenz-Detektoreinrichtung positioniert. Bei einem Messaufbau mit einem inversen Mikroskop (Detektion des Durchlichts / Anregung und Detektion der Fluoreszenz von der Bodenfläche 33 her) befindet sich die Maske beispielsweise auf der oberen Seite (Deckfläche) des Mikrosystems. Diese Ausführungsform ist zur Verbesserung des Signal-Rausch-Verhältnisses bei schwach fluoreszierenden Zellen von besonderem Vorteil.

Die Maske besteht, um das von der anderen Seite eingespeiste Durchlicht auszublenden, aus einem lichtundurchlässigen Materi-



al, insbesondere einer absorbierenden Schicht. Die Maske kann beispielsweise eine hochreflektierende Metallschicht oder ein stark absorbierendes Material, z.B. geschwärztes Pt umfassen. Eine Metallschicht erfordert ggf. einen entsprechend abgestimmten dichroitischen Spiegel, damit das reflektierte Fluoreszenzanregungslicht nicht die Fluoreszenzemissionmessung stört. Eine Pt-Schicht lässt sich einfach elektrolytisch aus „normalem“ Pt im Kanal prozessieren. Es würde das Durchlicht reflektieren und die Fluoreszenz (Anregung und Emission) absorbieren. Diese Variante ist besonders vorteilhaft, da die Fluoreszenzanregung (z.B. 488 nm) dann nicht die Fluoreszenzemissionmessung sowie Durchlichtmessung beeinflussen kann.

Die Messeinrichtung 10 ist mit einer schematisch nur in Figur 1 illustrierten Auswertungseinrichtung 40 verbunden, die der Bewertung der Detektorsignale dient und insbesondere eine Vergleichereinrichtung 41 enthält, deren Funktion unten erläutert wird.

Stromaufwärts vor den Messstationen 11, 12 ist eine Fokussiereinrichtung 50 vorgesehen. Die trichterförmige Fokussiereinrichtung 50 dient der geraden Aufreihung der Zellen entlang einem Durchlassbereich mit einer Breite entsprechend der Breite der Detektoren der Messeinrichtung 10. Die Fokussiereinrichtung 50 umfasst in an sich bekannter Weise Fokussierelektroden in Form von geraden Elektrodenstreifen, die jeweils an der Deckfläche und/oder am Boden 33 vom Kanalrand hin zur Kanalmitte gerichtet sind. Die Enden der Fokussierelektroden sind voneinander beabstandet, so dass der Durchlassbereich gebildet wird. Die Fokussierelektroden sind jeweils über eine Anschlussleitung (nicht dargestellt) mit einer Steuereinrichtung (mit einer Hochfrequenzspannungsquelle) verbunden.

Stromabwärts nach den Messstationen 11, 12 ist ein dielektrischer Feldkäfig 60 mit einer Gruppe von acht streifenförmigen

Elektroden vorgesehen, in dem eine Zelle 25 in an sich bekannter Weise unter der Wirkung von Hochfrequenzfeldern festgehalten und vermessen werden kann. Die Messung im Feldkäfig 60 umfasst beispielsweise eine Elektrorotationsmessung oder eine hochauflösende Fluoreszenzmessung.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens umfasst die folgenden Schritte. Zunächst strömen die Zellen 21 mit der Flüssigkeit ungeordnet durch den Kanal 30, bis sie an die Fokussiereinrichtung 50 gelangen. An dieser wird mit den Fokussierelektroden eine trichterförmige Feldbarriere gebildet, die sich in Strömungsrichtung verengt. In der damit gebildeten Aufreihung passieren die Zellen 20 auf einer gemeinsamen Trajektorie die Messstationen 11, 12.

An der ersten Messstation 11 erfolgt als erste Messung eine Durchlichtmessung zum Beispiel im Phasenkontrastverfahren. Sobald die Zelle 24 über der ersten Messstation 11 erscheint, wird ein erstes Positivsignal erzeugt, dass den Zeitpunkt der Passage repräsentiert. Des weiteren liefert die Durchlichtmessung ein Bild oder bei Maskierung der Detektoreinrichtung ein Teilbild der Zelle 24, das als morphologischen Parameter eine Information über zum Beispiel die Art des Objektes, die Objektgröße oder -form oder den Objektzustand (zum Beispiel lebende/tote Zelle) liefert. Zusätzlich lässt sich bei geeigneter Maskenform die Geschwindigkeit des Objektes bestimmen.

Zeitlich und räumlich versetzt erfolgt an der zweiten Messstation 11 als zweite Messung eine Fluoreszenzmessung. Sobald die Zelle über der zweiten Messstation 12 erscheint, wird ein zweites Positivsignal erzeugt. Des weiteren liefert die Fluoreszenzmessung eine Aussage, ob die Zelle zum Beispiel mit einem bestimmten Marker beladen ist oder eine spezifische Substanz (z. B. Expression von Genen mittels GFP) enthält. Die Fluoreszenzmessung kann wie die Durchlichtmessung abbildend erfolgen,

wobei eine an sich bekannte Detektormaskierung (siehe oben) vorgesehen sein kann.

Alternativ kann eine umgekehrte Detektionsreihenfolge vorgesehen sein, indem erst die Fluoreszenz und dann der Phasenkontrast gemessen wird. Dies kann vorteilhaft sein, wenn die Fluoreszenzereignisse sehr selten sind.

Die Positivsignale und die Detektorsignale der Messstationen werden an die Auswertungseinrichtung 40 geliefert. Die Korrelation der Positivsignale (Zeitdifferenz) erlaubt die Bestimmung der Objektgeschwindigkeit und damit das Auslösen zum Schalten weiterer dielektrischer und/oder optischer Elemente, beispielsweise des dielektrischen Feldkäfigs 60. Die Detektorsignale werden mit der Vergleichereinrichtung 41 mit bestimmten, in der Auswertungseinrichtung gespeicherten Erwartungswerten verglichen, ebenfalls um Steuersignale für nachgeordnete dielektrische und/oder optische Elemente zu gewinnen.

Gemäß Figur 1 werden beispielsweise ungefärbte (22) und Calcein-gefärbte (23) Zellen aufgereiht und vermessen. Eine hochaufgelöste fluoreszenzmikroskopische Untersuchung (insbesondere Abbildung) soll im Feldkäfig 60 erfolgen, wenn die Zellen leben und gefärbt (fluoreszierend) sind. Entsprechend werden die Detektorsignale der Messstationen mit bestimmten Erwartungswerten in Bezug auf die Zellen (lebend/tot) und die Intensität bei der Fluoreszenzdetektion (Schwellwertvergleich) verglichen. Sind beide Voraussetzungen für eine bestimmte Zelle erfüllt, wird automatisch zeitlich abgestimmt der Feldkäfig 60 angesteuert, so dass die Zelle gefangen wird, und die Flüssigkeitsströmung im Kanal 30 für die Dauer der hochaufgelösten mikroskopischen Untersuchung gestoppt. Für diese kann vorteilhafterweise die Beleuchtungseinrichtung der zweiten Messstation 12 zum Feldkäfig 60 verschoben werden. Tote oder nicht fluoreszierende Zellen würden zwar registriert, aber nicht im Feldkäfig 60 gefan-

gen werden. Vorteilhafterweise wird dadurch der Durchsatz erheblich erhöht, was sich besonders beim "rare event sorting" auswirkt, bei dem nach seltenen Ereignissen in einer Vielzahl von Proben (zum Beispiel 1:100) gesucht wird.

In Abhängigkeit von Steuersignalen der Auswertungseinrichtung können nachgeordnete dielektrische Weichen betätigt werden, um bestimmte Zellen in einen Nachbarkanal abzulenken oder aus dem Mikrosystem in eine Kultivierungseinrichtung auszukoppeln. Die Ablenkung in einen Nachbarkanal erfolgt umgekehrt zu dem in Figur 4 gezeigten Prinzip.

Gemäß einer abgewandelten, in Figur 2 gezeigten Ausführungsform der Erfindung umfasst die erste Messstation 11 einen Impedanzdetektor 13. Der Impedanzdetektor 13 ist in Strömungsrichtung mit einem Abstand im Bereich von zum Beispiel 10  $\mu\text{m}$  bis 2 mm von der Fokussiereinrichtung 50 angeordnet. Der Impedanzdetektor umfasst in an sich bekannter Weise zum Beispiel zwei oder vier Detektorelektroden, die an der Deckfläche und/oder am Boden 33 des Kanals 30 angeordnet sind und zur Impedanzmessung im Kanal 30 mit Wechselspannungen beaufschlagt werden. Mit dem Impedanzdetektor 13 wird ein Messsignal gewonnen, aus dem analog zur optischen Messung die Größe der Zelle und ggf. der Vitalitätszustand abgeleitet werden kann. Vorteilhafterweise können störende Streulichteefekte zwischen den Messstationen vermieden werden. Das Zusammenwirken mit der zweiten Messstation 12 und der Auswertungseinrichtung (nicht gezeigt) erfolgt, wie es oben beschrieben ist.

Figur 3 zeigt eine Ausführungsform der Erfindung, bei der den ersten und zweiten Messstationen 11, 12 weitere Messstationen 14, 15, ... nachgeordnet sind. Die Messstationen 14, 15, ... sind wie die Messstation 12 für eine Fluoreszenzmessung eingerichtet und ebenfalls mit der Auswertungseinrichtung (nicht gezeigt) verbunden. Diese Gestaltung ermöglicht, dass zunächst

ein erster Zellparameter (zum Beispiel die Größe) bei der Messstation 11 und anschließend wiederholt ein zweiter Zellparameter (zum Beispiel die Fluoreszenzintensität) bei den Messstationen 12 und 14, 15, ... gemessen wird. Es wird eine Folge von Fluoreszenzintensitäten ermittelt, die charakteristisch für die Kinetik einer Veränderung der Zellen bei der Passage an der Messeinrichtung 10 ist.

Beispielsweise werden Zellen 20 in einer Fluoreszenzfarbstofflösung suspendiert durch den Kanal 30 geströmt und mit der Fokussiereinrichtung 50 aufgereiht. Im Lauf der Bewegung reichert sich zunehmend Farbstoff in den Zellen an. Der Grad der Anreicherung kann an den Messstationen quantitativ erfasst werden (z. B. Erfassung einer Kalzium-Kinetik oder einer progressive Beladung mit einem fluoreszierenden Stoff, z. B. CalceinAM). Durch korrelierte Auswertung der einzelnen Detektorsignale kann die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Zeit spezifisch für die einzelnen Zellen gemessen werden.

Figur 4 illustriert eine Anwendung der Erfindung in einem Zweikanalsystem. Das Mikrosystem 100 umfasst zwei Kanäle 34, 35, die über eine Durchtrittsöffnung 36 in einer Trennwand 37 verbunden sind. Eine Messeinrichtung 10 und weitere Messstationen befinden sich analog zu Figur 3 im Kanal 35. In einer Trägerflüssigkeit suspendierte Zellen 20 werden im Kanal 34 eingespült. Über ein kombiniertes dielektrisches Element 50, das eine Ablenkfunktion und die oben genannte Trichterfunktion kombiniert, können die Zellen in den zweiten Kanal 35 überführt und dort dielektrisch aufgereiht werden. Im Kanal 35 ist allgemein ein anderes chemisches Milieu oder z. B. eine Fluoreszenzfarbstofflösung gegeben. In den überführten Zellen reichert sich der Farbstoff im Lauf der Zeit an. Analog zu Figur 3 erfolgt an vorbestimmten Messorten eine Fluoreszenzauslesung und eine Messung der Kinetik der Farbstoffanreicherung. Die Anregung der Zellen erfolgt hierbei mit einer flächigen Beleuchtung (Objek-

tivsichtfeld). Zur Verringerung des Ausbleichens ist die Kopplung von lokaler Anregung und Detektion vorteilhaft.

Die Ablenkfunktion des kombinierten dielektrischen Elements 50 kann so eingestellt sein, dass bestimmte Zellen die Feldbarriere im Kanal 34 passieren (z.B. kleine Zellen, auf die im Vergleich zur hydrodynamischen Kraft nur eine geringe dielektrophoretische Kraft wirkt), während die übrigen Zellen in den Kanal 35 abgelenkt werden (große Zellen). Das Überführen in den Kanal 34 kann ferner in Abhängigkeit von den Detektorsignalen der Messeinrichtung 10 so gesteuert werden, dass verhindert wird, dass sich gleichzeitig zu viele Zellen im Bereich der Messeinrichtung 10 befinden. In dem Kanal 34 kann jedoch ebenfalls eine Untersuchung erfolgen, wobei die vorstehend beschriebenen Untersuchungsverfahren angewendet werden können.

Erfindungsgemäß kann ein dielektrischen Element vorgesehen sein, mit dem anströmende Partikel, insbesondere Zellen auf mehreren Trajektorien getrennt aufgereiht und getrennten Messeinrichtungen zugeführt werden, die im oder am Mikrosystem angeordnet sind.

Das in Figur 5 dargestellte Ausführungsbeispiel stimmt weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen und in Figur 1 dargestellten Ausführungsbeispiel überein, so dass zur Vermeidung von Wiederholungen auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird und im Folgenden nur die Besonderheiten dieses Ausführungsbeispiels beschrieben werden. Darüber hinaus werden im Folgenden für entsprechende Bauteile dieselben Bezugszeichen wie in der Beschreibung zu Figur 1 verwendet, um die Zuordnung zu erleichtern.

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht darin, dass in dem Kanal 30 zwischen der Fokussiereinrichtung 50 und dem Feldkäfig 60 stromaufwärts vor der Messstation 11 eine ha-

kenförmige Elektrodenanordnung 70 angeordnet ist, die es ermöglicht, in dem Trägerstrom suspendierte Partikel festzuhalten und vor der Messstation zu parken. Der Aufbau und die Funktionsweise der Elektrodenanordnung 70 ist beispielsweise in Müller, T. et al.: "Life Cells in Cellprocessors" in Bioworld 2, 2002 beschrieben, so dass auf eine detaillierte Beschreibung der Elektrodenanordnung 70 verzichtet werden kann und der Inhalt dieser Druckschrift der vorliegenden Beschreibung in vollem Umfang zuzurechnen ist.

Eine weitere Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht darin, dass der Kanal 30 stromabwärts hinter dem Feldkäfig 60 in zwei Ausgangsleitungen 71, 72 verzweigt, um die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel in Abhängigkeit von dem Untersuchungsergebnis der Messstationen 11, 12 zu selektieren. Die Ausgangsleitung 71 dient hierbei zur Aufnahme und Abführung von negativ selektierten Partikeln, wohingegen die Ausgangsleitung 72 zur Aufnahme und Weiterführung positiv selektierter Partikel dient.

Die Verteilung der Partikel auf die beiden Ausgangsleitungen 71, 72 erfolgt hierbei durch eine weitere Elektrodenanordnung 73, die im Bereich der Verzweigungsstelle der beiden Ausgangsleitungen 71, 72 angeordnet ist und bei einer elektrischen Ansteuerung die positiv selektierten Partikel in die Ausgangsleitung 72 treibt. Der Aufbau und die Funktionsweise der Elektrodenanordnung 73 ist beispielsweise in Müller, T. et al.: "A 3-D- microelectrode system for handling and caging single cells and particles" in Biosensors & Bioelectronics 14 (1999) 247-256 beschrieben, so dass auf eine detaillierte Beschreibung der Elektrodenanordnung 73 verzichtet werden kann und der Inhalt der vorstehend erwähnten Druckschrift der vorliegenden Beschreibung in vollem Umfang zuzurechnen ist.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass die Fokussiereinrichtung 50, die Elektrodenanordnung 70, die beiden Messstationen 11, 12, der Feldkäfig 60 und die Elektrodenanordnung 73 in dem Kanal 30 außermittig auf der Seite der Ausgangsleitung 71 angeordnet sind. Dies hat zur Folge, dass der von der Fokussiereinrichtung 50 in dem Kanal 30 außermittig fokussierte Partikelstrom ohne äußere Einwirkung automatisch in die Ausgangsleitung 71 für negativ selektierte Partikel gelangt, wohingegen eine aktive Ansteuerung der Elektrodenanordnung 73 erforderlich ist, um die Partikel in die Ausgangsleitung 72 für positiv selektierte Partikel zu befördern. Diese außermittige Anordnung eignet sich deshalb besonders bei Untersuchungen, bei denen nur wenige Partikel positiv selektiert werden, da die Elektrodenanordnung 73 dann nur selten angesteuert werden muss.

Weiterhin ist zu erwähnen, dass in der Ausgangsleitung 72 für die positiv selektierten Partikel eine weitere Fokussiereinrichtung 74 angeordnet ist, die im Aufbau und in der Funktion der Fokussiereinrichtung 50 in dem Kanal 30 entspricht. Die Fokussiereinrichtung 74 hat die Aufgabe, ein Absinken der Partikel in der Ausgangsleitung 72 zu verhindern und die Partikel in der Ausgangsleitung 72 mittig im Bereich großer Strömungsgeschwindigkeiten zu halten. Dies ist vorteilhaft, da die Strömungsgeschwindigkeit in der Ausgangsleitung 72 von der Mitte nach außen hin abnimmt, so dass sich die Partikel bei einem Absinken in der Ausgangsleitung 72 wandnah ablagern könnten, was durch die Fokussiereinrichtung 74 verhindert wird.

Schließlich ist noch zu erwähnen, dass dieses Ausführungsbeispiel 2 Hüllstromzuleitungen 75, 76 aufweist, die stromabwärts hinter der Fokussiereinrichtung 74 in die Ausgangsleitung 72 münden und einen Hüllstrom zuführen, um z.B. eine schnelle und sichere Probenablage zu gewährleisten.



Das in Figur 6 dargestellte Ausführungsbeispiel stimmt weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen und in Figur 5 dargestellten Ausführungsbeispiel überein, so dass zur Vermeidung von Wiederholungen weitgehend auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird, während im Folgenden nur die Besonderheiten dieses Ausführungsbeispiels beschrieben werden.

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht darin, dass der Feldkäfig 60 im Verzweigungsbereich der beiden Ausgangsleitungen 71, 72 angeordnet ist und hierbei zwei Funktionen erfüllt, nämlich zum einen die Fixierung der Partikel zur Untersuchung durch die Messstation 12 und zum anderen die Verteilung der Partikel auf die beiden Ausgangsleitungen 71, 72.

Das in Figur 7 dargestellte Ausführungsbeispiel stimmt weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen und in Figur 6 dargestellten Ausführungsbeispiel überein, so dass zur Vermeidung von Wiederholungen weitgehend auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird, während im Folgenden lediglich die Besonderheiten dieses Ausführungsbeispiels beschrieben werden.

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht in der konstruktiven Gestaltung des Feldkäfigs 60, der hier aus sechs räumlich verteilt angeordneten Elektroden besteht. Der Feldkäfig 60 ist hierbei jedoch ebenfalls bifunktional und ermöglicht sowohl eine Fixierung von Partikeln in dem Trägerstrom zur Untersuchung durch die Messstation 12 als auch eine Verteilung der Partikel auf beiden Ausgangsleitungen 71, 72.

Weiterhin sind die Fokussiereinrichtung 50, die Elektrodenanordnung 70, der Feldkäfig 60 und die Messstationen 11, 12 hierbei in dem Kanal 30 mittig angeordnet, was auch für die folgenden Figuren 8 und 9 entsprechend gilt.

Das in Figur 8 dargestellte Ausführungsbeispiel stimmt weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen und in Figur 7 dargestellten Ausführungsbeispiel überein, so dass zur Vermeidung von Wiederholungen weitgehend auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird, während im Folgenden nur die Besonderheiten dieses Ausführungsbeispiels beschrieben werden.

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht darin, dass in dem Kanal 30 an der Verzweigungsstelle der beiden Ausgangsleitungen 71, 72 ein Sortierelement 77 in Form einer Elektrodenanordnung angeordnet ist, um die in den Partikelstrom suspendierten Partikel in Abhängigkeit von der Untersuchung durch die Messstation 11, 12 einer der beiden Ausgangsleitungen 71, 72 zuzuführen. Die Sortiereinrichtung wird auch als "Ultra-Fast Sorter" (UFS) bezeichnet und ermöglicht eine schnelle Sortierung der suspendierten Partikel. Die übereinander liegenden Pfeilelektroden sind hierbei permanent aktiviert, während das Umlenken in die Ausgangsleitung 71 bzw. in die Ausgangsleitung 72 durch Schalten des unteren bzw. oberen Eingangselektrodenpärchens der Sortiereinrichtung 77 erfolgt. Hierbei ist zu erwähnen, dass der laterale Abstand der Elektroden geringer als der vertikale Abstand ist.

Figur 9 zeigt ein weiteres Ausführungsbeispiel, bei dem der Kanal 30 zwei Eingangsleitungen 78, 79 aufweist, die in den Kanal 30 münden und jeweils einen Trägerstrom mit suspendierten Partikeln zuführen.

In den beiden Eingangsleitungen 78, 79 ist jeweils eine Fokussiereinrichtung 80, 81 angeordnet, um die in den beiden Trägerströmen der Eingangsleitungen 78, 79 enthaltenen Partikel zu fokussieren.

In dem Kanal 30 ist stromaufwärts im Bereich der Mündungsstelle der Eingangsleitungen 78, 79 eine Trennwand 82 angeordnet, wel-

che die über die beiden Eingangsleitungen 78, 79 zugeführten Trägerströme in dem stromaufwärts gelegenen Bereich des Kanals 30 zunächst voneinander trennt. Die Trennwand 82 ist jedoch lediglich optional, so dass auch auf die Trennwand 82 verzichtet werden kann.

Beiderseits der Trennwand 82 ist in dem Kanal 30 jeweils eine Messstation 83, 84 angeordnet, um die in den beiden Teilströmen suspendierten Partikel zu untersuchen.

In Abhängigkeit von dieser Untersuchung werden die Partikel durch eine Fokussiereinrichtung 85 entweder mittig fokussiert und dem Feldkäfig 60 zugeführt oder sie strömen seitlich an dem Feldkäfig 60 vorbei und gelangen in zwei Ausgangsleitungen 86, 87 für negativ selektierte Partikel.

In dem Kanal 30 befindet sich eine weitere Messstation 88, die eine Untersuchung der suspendierten Partikel in dem Feldkäfig 60, d.h. im abgebremsten Zustand, ermöglicht.

In Abhängigkeit von dieser weiteren Untersuchung werden die Partikel dann durch eine Sortiereinrichtung 89 entweder einer der beiden Ausgangsleitungen 86, 87 für negativ selektierte Partikel oder einer weiteren Ausgangsleitung 90 für positiv selektierte Partikel zugeführt.

Das in Figur 10 dargestellte Ausführungsbeispiel stimmt weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen und in Figur 5 dargestellten Ausführungsbeispiel überein, so dass weitgehend auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird und im Folgenden lediglich die Besonderheiten dieses Ausführungsbeispiels beschrieben werden.

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht darin, dass in dem Kanal 30 kein Feldkäfig angeordnet ist, um die dem

Trägerstrom suspendierten Partikel zu fixieren. Die Untersuchung der in dem Trägerstrom suspendierten Partikel erfolgt hierbei also während ihrer Strömungsbewegung.

Eine weitere Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht in der konstruktiven Gestaltung der Elektrodenanordnung 73, die hier als Doppelelektrode ausgeführt ist.

Die Fokussierungseinrichtung 50, die Elektrodenanordnung 70, die beiden Messstationen 11, 12 und die Elektrodenanordnung 73 sind hierbei ebenfalls außermittig auf der Seite der Ausgangsleitung 71 für die negativ selektierten Partikel angeordnet, so dass die Elektrodenanordnung 73 aktiv angesteuert werden muss, um die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel in die Ausgangsleitung 72 für positiv selektierte Partikel zu befördern. Diese außermittige Anordnung eignet sich deshalb besonders für Untersuchungen, bei denen nur ein geringer Prozentsatz von Partikeln positiv selektiert wird.

Das in Figur 11 dargestellte Ausführungsbeispiel stimmt weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen und in Figur 10 dargestellten Ausführungsbeispiel überein, so dass zur Vermeidung von Wiederholungen auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird und im Folgenden nur die Besonderheiten dieses Ausführungsbeispiels erläutert werden.

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht darin, dass die Fokussiereinrichtung 50, die Elektrodenanordnung 70, die beiden Messstationen 11, 12 und die Elektrodenanordnung 73 in dem Kanal 30 außermittig auf der Seite der Ausgangsleitung 72 für positiv selektierte Partikel angeordnet sind. Ohne eine aktive Ansteuerung der Elektrodenanordnung 73 gelangen die in dem Trägerstrom suspendierten und von der Fokussiereinrichtung 50 in dem Kanal 30 außermittig fokussierten Partikel also automatisch in die Ausgangsleitung 72 für positiv selektierte Par-

tikel, wohingegen die Elektrodenanordnung 73 aktiv angesteuert werden muss, um die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel in die Ausgangsleitung 71 für negativ selektierte Partikel zu fördern.

Diese außer mittige Anordnung eignet sich deshalb besonders für solche Untersuchungen, bei denen nur ein geringer Prozentsatz der suspendierten Partikel negativ selektiert wird.

Das in Figur 12 dargestellte Ausführungsbeispiel stimmt weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen und in Figur 10 dargestellten Ausführungsbeispiel überein, so dass zur Vermeidung von Wiederholungen auf die vorstehende Beschreibung verwiesen wird und im Folgenden nur die Besonderheiten dieses Ausführungsbeispiels erläutert werden.

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht darin, dass der Kanal 30 stromabwärts unter den beiden Messstationen 11, 12 in drei Ausgangsleitungen 91, 92, 93 verzweigt, so dass die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel in drei Klassen eingeteilt werden können.

Das in Figur 13 dargestellte Ausführungsbeispiel stimmt schließlich weitgehend mit dem vorstehend beschriebenen und in Figur 12 dargestellten Ausführungsbeispiel überein, so dass zur Vermeidung von Wiederholungen auf die vorstehende Beschreibung zu Figur 12 verwiesen wird und im Folgenden nur die Besonderheiten dieses Ausführungsbeispiels erläutert werden.

Eine Besonderheit dieses Ausführungsbeispiels besteht darin, dass die beiden Messstationen 11, 12 nicht in Strömungsrichtung hintereinander liegen, sondern bezüglich der Strömungsrichtung seitlich zueinander versetzt sind, wobei zwischen den beiden Messstationen 11, 12 eine Ablenkeinrichtung 94 angeordnet ist, die eine seitliche Ablenkung der in dem Trägerstrom suspendier-

ten Partikel ermöglicht. Ohne eine aktive Ansteuerung der Ablenkeinrichtung 94 passieren die in dem Trägerstrom suspendierten und von der Fokussiereinrichtung fokussierten Partikel also nur die Messstation 11 und strömen seitlich an der Messstation 12 vorbei.

Bei einer Ansteuerung der Ablenkeinrichtung 94 werden die in dem Trägerstrom suspendierten Partikel nach dem Verlassen der Messstation 11 dagegen seitlich zu der Messstation 12 abgelenkt und passieren diese ebenfalls. Die Ansteuerung der Ablenkeinrichtung 94 erfolgt hierbei in Abhängigkeit von dem Ergebnis der Untersuchung durch die Messstation 11.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen und den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausgestaltungen von Bedeutung sein.

15911/PCT

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung von Eigenschaften von Partikeln (20, 21, 22), die sich in einer Flüssigkeit suspendiert durch ein fluidisches Mikrosystem bewegen, mit einer ersten Messung eines ersten Parameters eines bestimmten Partikels an einer ersten Messstation (11), einer zweiten Messung eines zweiten Parameters des Partikels mit einem Zeitabstand von der ersten Messung an einer zweiten Messstation (12), die von der ersten Messstation (11) räumlich getrennt ist, und einer gemeinsamen, korrelierten Evaluierung der ersten und zweiten Parameter,

**dadurch gekennzeichnet, dass**

die ersten und zweiten Parameter für verschiedene Eigenschaften des gemessenen Partikels charakteristisch sind, und die Evaluierung einen Vergleich und/oder eine Korrelation der ersten und zweiten Parameter mit vorbestimmten Erwartungswerten umfasst, wobei in Abhängigkeit vom Ergebnis des Vergleiches eine weitere Messung oder Manipulationen am gemessenen Partikel folgen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, bei dem als erster oder zweiter Parameter ein morphologischer Parameter des Partikels ermittelt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 2, bei dem die Messung eine Durchlichtmessung und/oder eine Impedanzmessung und/oder eine elektrische Messung und/oder eine magnetische Messung umfasst.

4. Verfahren nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 3, bei dem als erster oder zweiter Parameter ein stofflicher Parameter des Partikels ermittelt wird, der für die chemische oder biologische Zusammensetzung des Partikels charakteristisch ist.

5. Verfahren nach Anspruch 4, bei dem die Messung eine Fluoreszenzmessung umfasst.
6. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 2 bis 5, bei dem der morphologische Parameter zeitlich vor dem stofflichen Parameter gemessen wird.
7. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche 2 bis 5, bei dem der stoffliche Parameter zeitlich vor dem morphologischen Parameter gemessen wird.
8. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem als synthetische oder biologische Partikel feste Partikel oder flüssige, vom Suspensionsmedium abgegrenzte Teilchen an den Messstationen vorbeitreten.
9. Verfahren nach Anspruch 8, bei dem die biologischen Partikel biologische Zellen, Zellgruppen, Zellbestandteile oder biologisch relevante Makromoleküle oder Zusammensetzungen aus diesen umfassen.
10. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem sich der gemessene Partikel während der ersten und zweiten Messungen mit der Flüssigkeit an den Messstationen vorbei bewegt.
11. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die im Ergebnis des Vergleiches durchgeführte mindestens eine weitere Messung eine Messung am ruhenden, in der Flüssigkeit festgehaltenen Partikel umfasst.
12. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem in Abhängigkeit vom Ergebnis des Vergleiches von mindestens zwei Messungen mindestens ein Manipulationselement



(60, 73, 77, 89) und/oder mindestens eine weitere Messstation (14, 15, 16) im Mikrosystem betätigt wird.

13. Verfahren nach Anspruch 12, bei dem in Abhängigkeit vom Ergebnis des Vergleiches mindestens ein dielektrischer Käfig (60), mindestens eine dielektrische Weiche (73), mindestens ein dielektrischer Manipulator und/oder mindestens ein optischer Manipulator und/oder ein magnetischer Manipulator betätigt werden.

14. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem aus den gemessenen Parametern die Zeit, die Richtung und/oder die Geschwindigkeit des Vorbeitritts des gemessenen Partikels an den Messstationen (11, 12) ausgewertet werden.

15. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem eine Vielzahl von Partikeln (20, 21, 22) aufeinanderfolgend gemessen und einzeln evaluiert werden.

16. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem an einer Vielzahl von Messstationen (11, 12, 14, 15, 16) eine Zeitabhängigkeit von mindestens einem der gemessenen Parameter aufgenommen wird.

17. Verfahren nach mindestens einem der vorhergehenden Ansprüche, bei dem die Partikel von einem ersten Kanal (34) in einen zweiten Kanal (35) überführt werden, in dem ein anderes chemisches Milieu als im ersten Kanal (34) gegeben ist und in dem unmittelbar nach der Überführung vom ersten Kanal (34) die ersten und folgenden Messungen durchgeführt werden.

18. Messeinrichtung (10) zur Messung von Eigenschaften von Partikeln (20, 21), die sich in einer Flüssigkeit suspendiert durch ein fluidisches Mikrosystem (30) bewegen, mit einer ersten Messstation (11) für eine erste Messung eines ersten Para-

metern eines Partikels (21), einer zweiten Messstation (12) für eine zweite Messung eines zweiten Parameters des Partikels, die von der ersten Messstation (11) räumlich getrennt angeordnet ist, und einer Auswertungseinrichtung (40) zur gemeinsamen, korrelierten Evaluierung der ersten und zweiten Parameter, **dadurch gekennzeichnet**, dass

die ersten und zweiten Messstationen (11, 12) zur Messung von Parametern eingerichtet sind, die für verschiedene Eigenschaften des Partikels (21) charakteristisch sind, und die Auswertungseinrichtung (40) eine Vergleichereinrichtung (41) zum Vergleich der ersten und zweiten Parameter mit vorbestimmten Erwartungswerten enthält, mit der in Abhängigkeit vom Ergebnis des Vergleiches ein Signal für weitere Messungen oder Manipulationen am Partikel erzeugt werden kann.

19. Messeinrichtung nach Anspruch 18, bei der die erste Messstation (11) eine Durchlicht-Detektoreinrichtung oder einen Impedanzdetektor (13) umfasst.

20. Messeinrichtung nach mindestens einem der Ansprüche 18 oder 19, bei der die zweite Messstation (12) eine Fluoreszenz-Detektoreinrichtung und/oder eine elektrische Detektoreinrichtung und/oder eine magnetische Detektoreinrichtung umfasst.

21. Messeinrichtung nach Anspruch 20, bei der die Fluoreszenz-Detektoreinrichtung zur Verminderung von störendem Streulicht mit einer Streulicht-Maske abgeschirmt ist.

22. Fluidisches Mikrosystem (30), das mit einer Messeinrichtung (10) nach mindestens einem der Ansprüche 18 bis 21 ausgestattet ist.

23. Fluidisches Mikrosystem nach Anspruch 22, bei dem die ersten und zweiten Messstationen (11, 12) in einem gemeinsamen Kanal des fluidischen Mikrosystems (30) angeordnet sind.

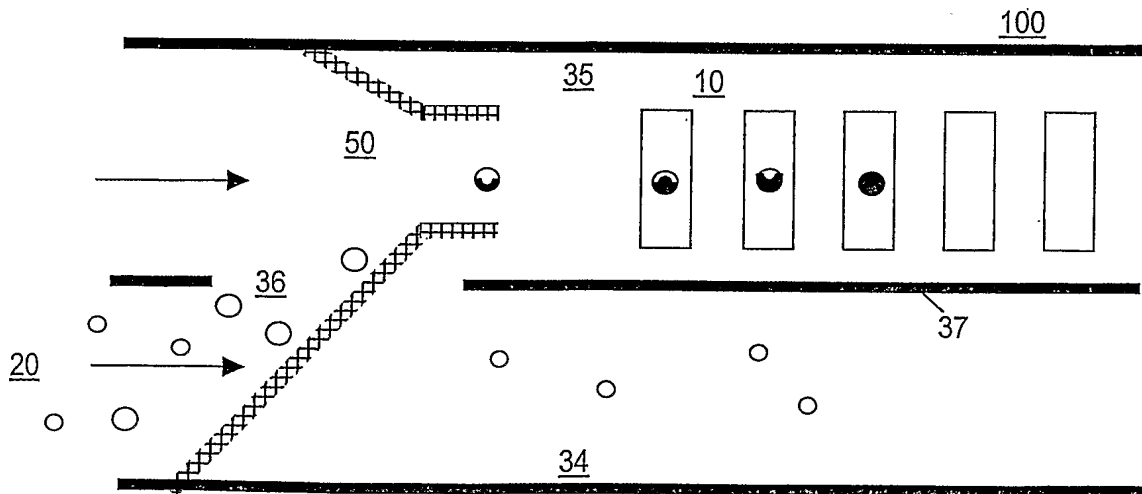
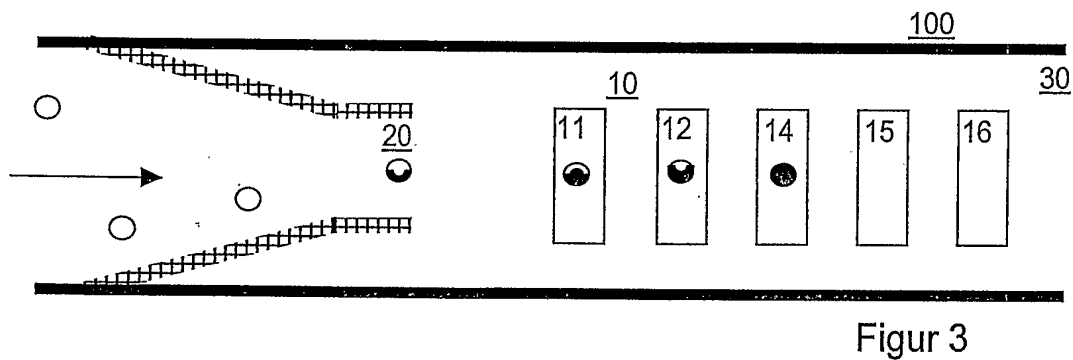
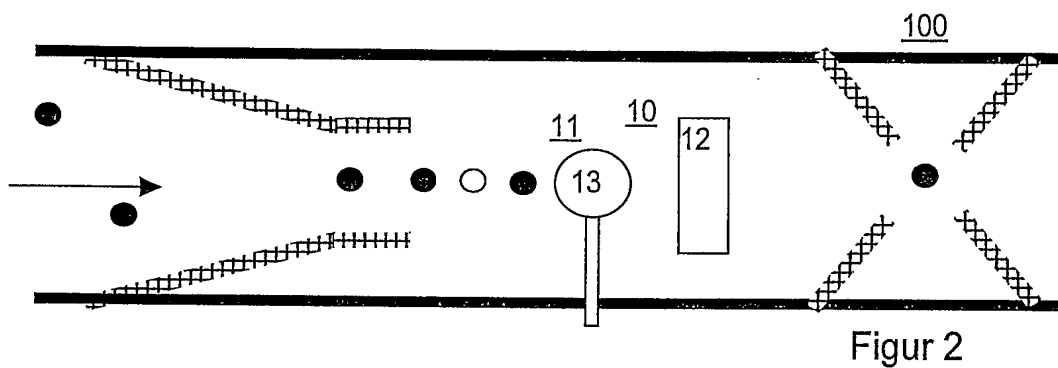
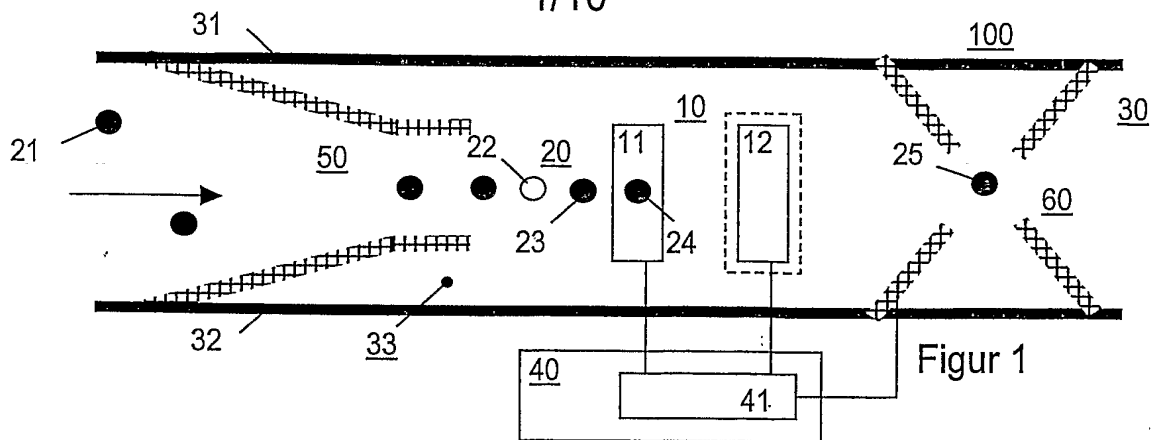
24. Fluidisches Mikrosystem nach mindestens einem der Ansprüche 22 oder 23, bei dem stromaufwärts vor der Anordnung der Messstationen (11, 12) Fokussierelektroden (50) vorgesehen sind.
25. Fluidisches Mikrosystem nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 24, das zwei Kanäle (34, 35) umfasst, die über eine Durchtrittsöffnung (36) in einer Trennwand (37) verbunden sind, wobei die Durchtrittsöffnung (36) stromaufwärts vor der Anordnung der Messstationen (11, 12) vorgesehen und mit einem Manipulationselement (50) zur Überführung von Partikeln (20, 21, 22) vom ersten (34) in den zweiten Kanal (35) ausgestattet ist.
26. Fluidisches Mikrosystem nach mindestens einem der Ansprüche 22 bis 25, bei dem stromabwärts nach der Anordnung der Messstationen (11, 12) weitere Messstationen (14, 15,...) und/oder Manipulationselemente vorgesehen sind.
27. Fluidisches Mikrosystem nach Anspruch 26, bei dem die Vergleichereinrichtung (41) mit den Messstationen (13, 14,...) und/oder Manipulationselementen verbunden ist, so dass diese mit dem Signal der Vergleichereinrichtung betätigbar sind.
28. Fluidisches Mikrosystem nach mindestens einem der Ansprüche 27 oder 28, bei dem die Messstationen (14, 15,...) und/oder Manipulationselemente mindestens einen dielektrischen Käfig (60), mindestens eine dielektrische Weiche, mindestens einen dielektrischen Manipulator und/oder mindestens einen optischen Manipulator umfassen.

15911/PCT

### **Zusammenfassung**

Es wird ein Verfahren zur Messung von Eigenschaften von Partikeln beschrieben, die sich in einer Flüssigkeit suspendiert durch ein fluidisches Mikrosystem bewegen, mit einer ersten Messung eines ersten Parameters eines bestimmten Partikels an einer ersten Messstation (11), einer zweiten Messung eines zweiten Parameters des Partikels mit einem Zeitabstand von der ersten Messung an einer zweiten Messstation (12), die von der ersten Messstation (11) räumlich getrennt ist, und einer gemeinsamen, korrelierten Evaluierung der ersten und zweiten Parameter, wobei die ersten und zweiten Parameter für verschiedene Eigenschaften des gemessenen Partikels charakteristisch sind, und die Evaluierung einen Vergleich der ersten und zweiten Parameter mit vorbestimmten Erwartungswerten umfasst, wobei in Abhängigkeit vom Ergebnis des Vergleiches eine weitere Messung oder Manipulationen am gemessenen Partikel folgen. Es wird auch ein fluidisches Mikrosystem beschrieben, das zur Umsetzung des Verfahrens ausgelegt ist.

(Fig. 1)



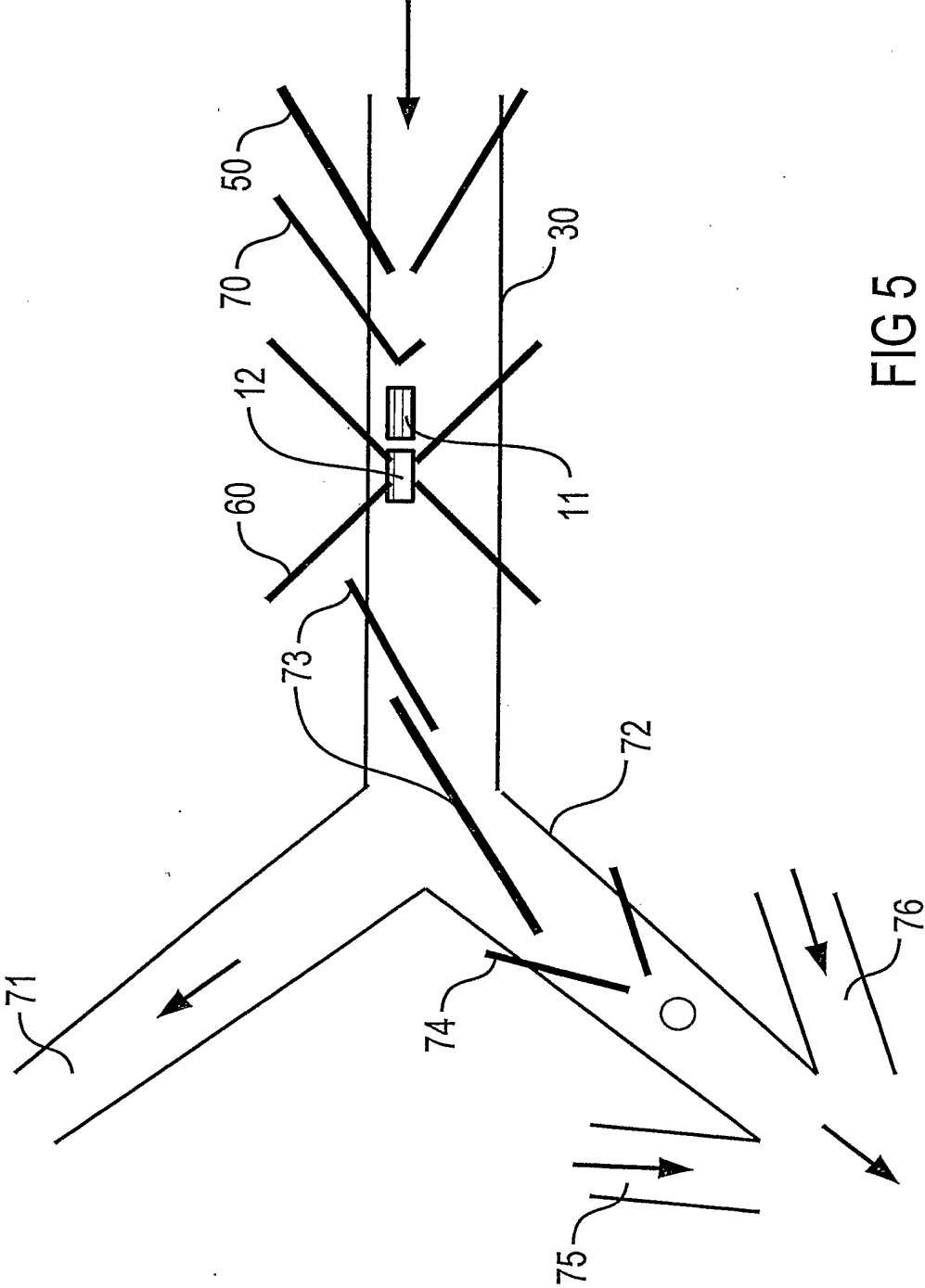


FIG 5

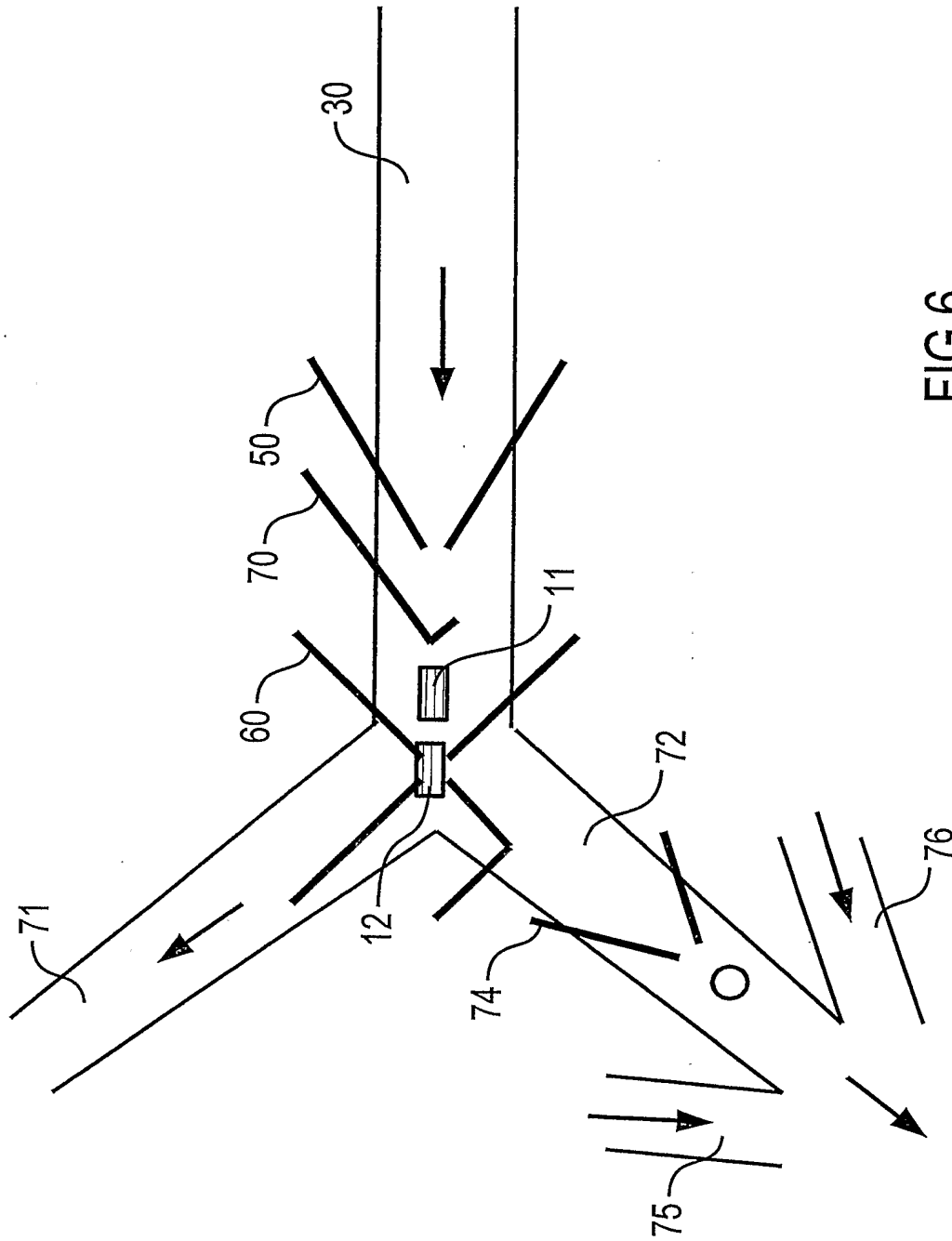
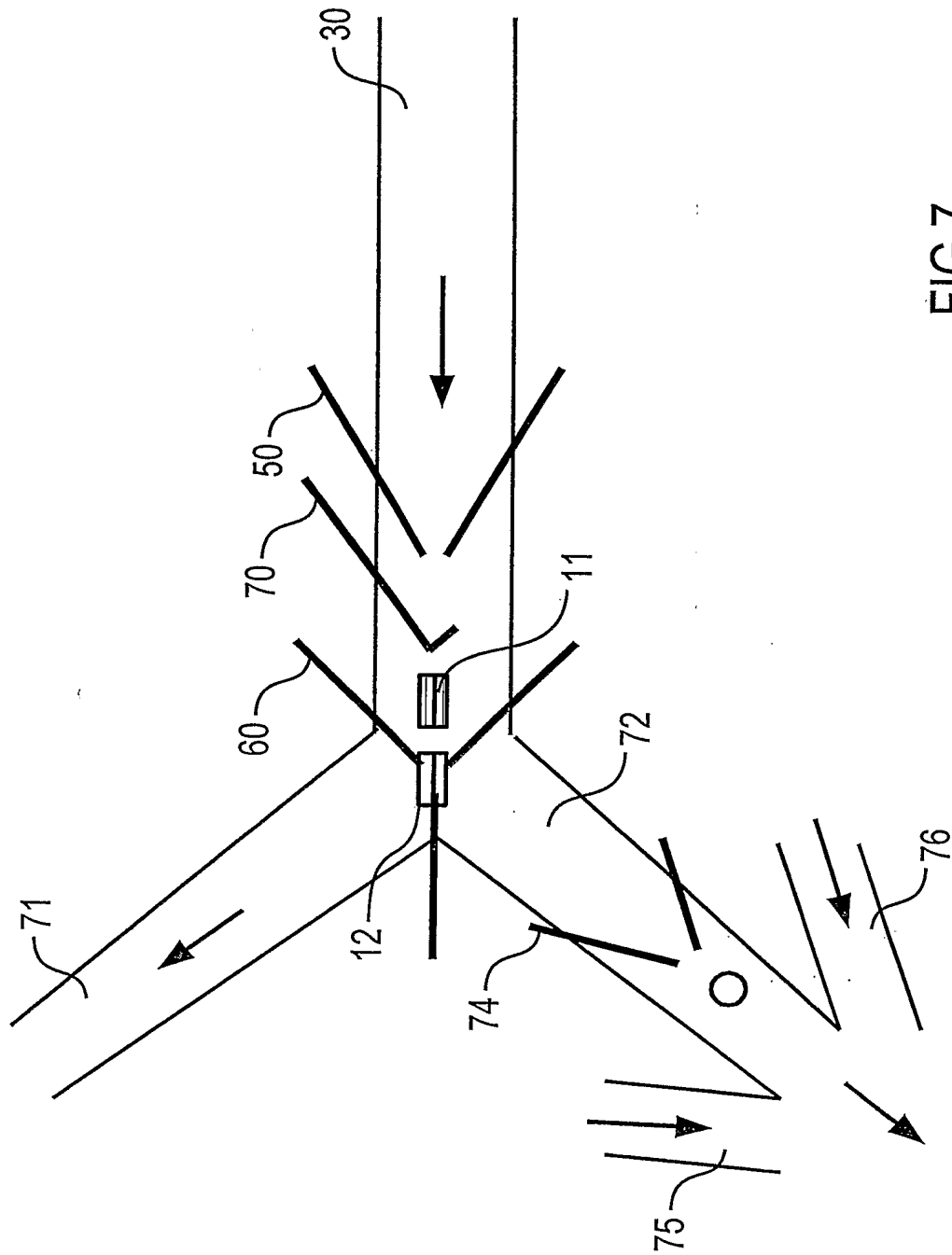
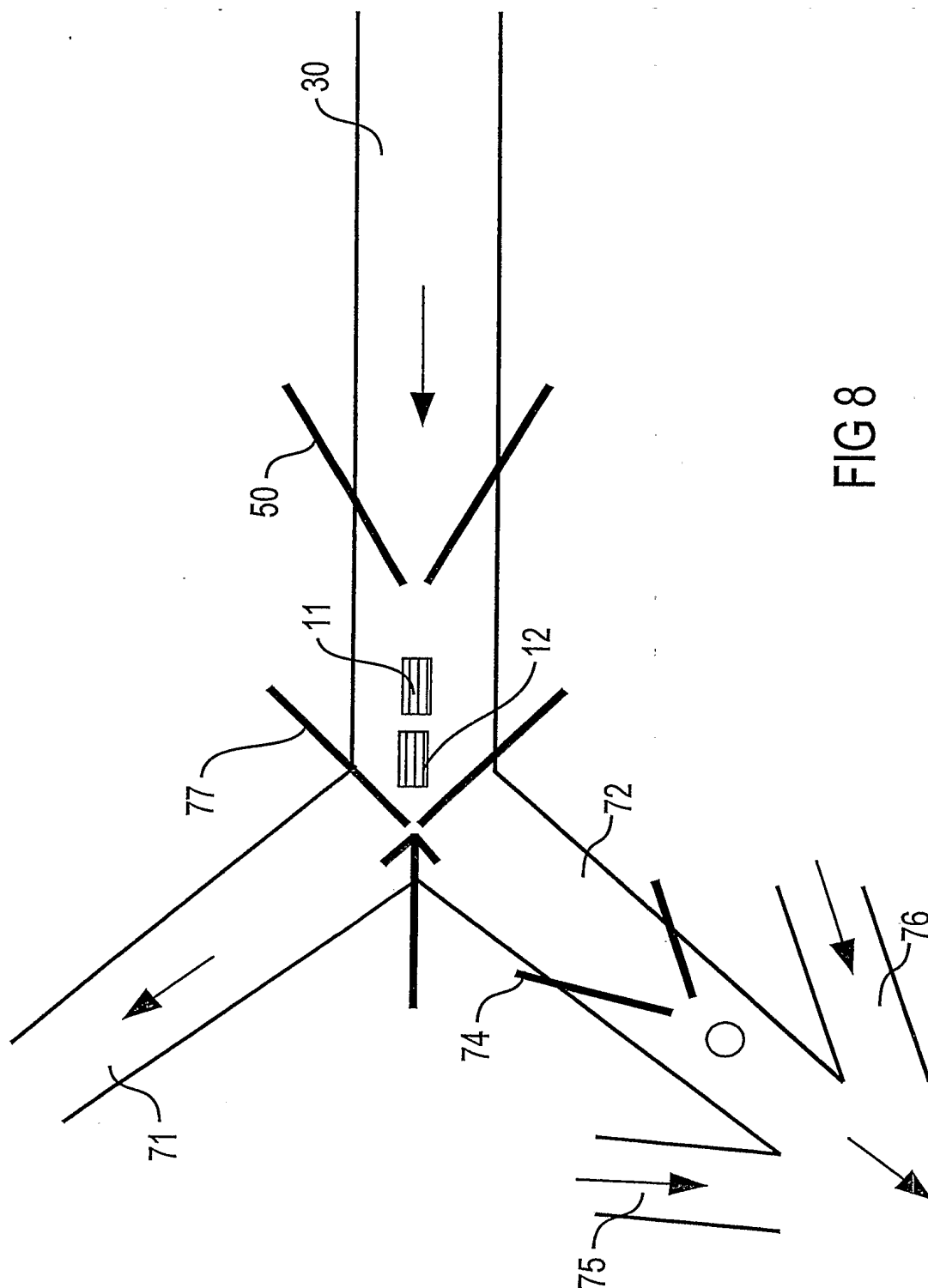


FIG 6







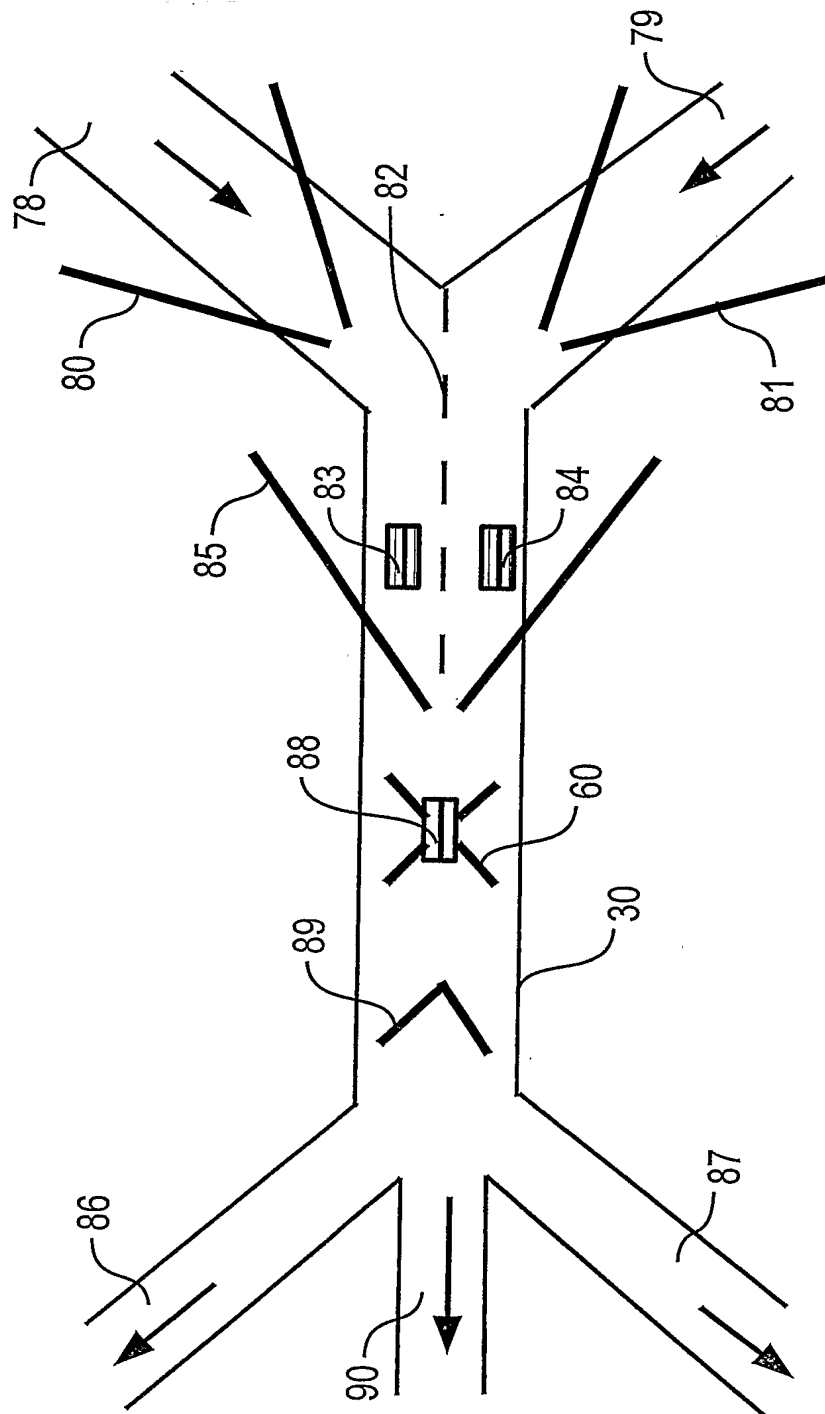


FIG 9

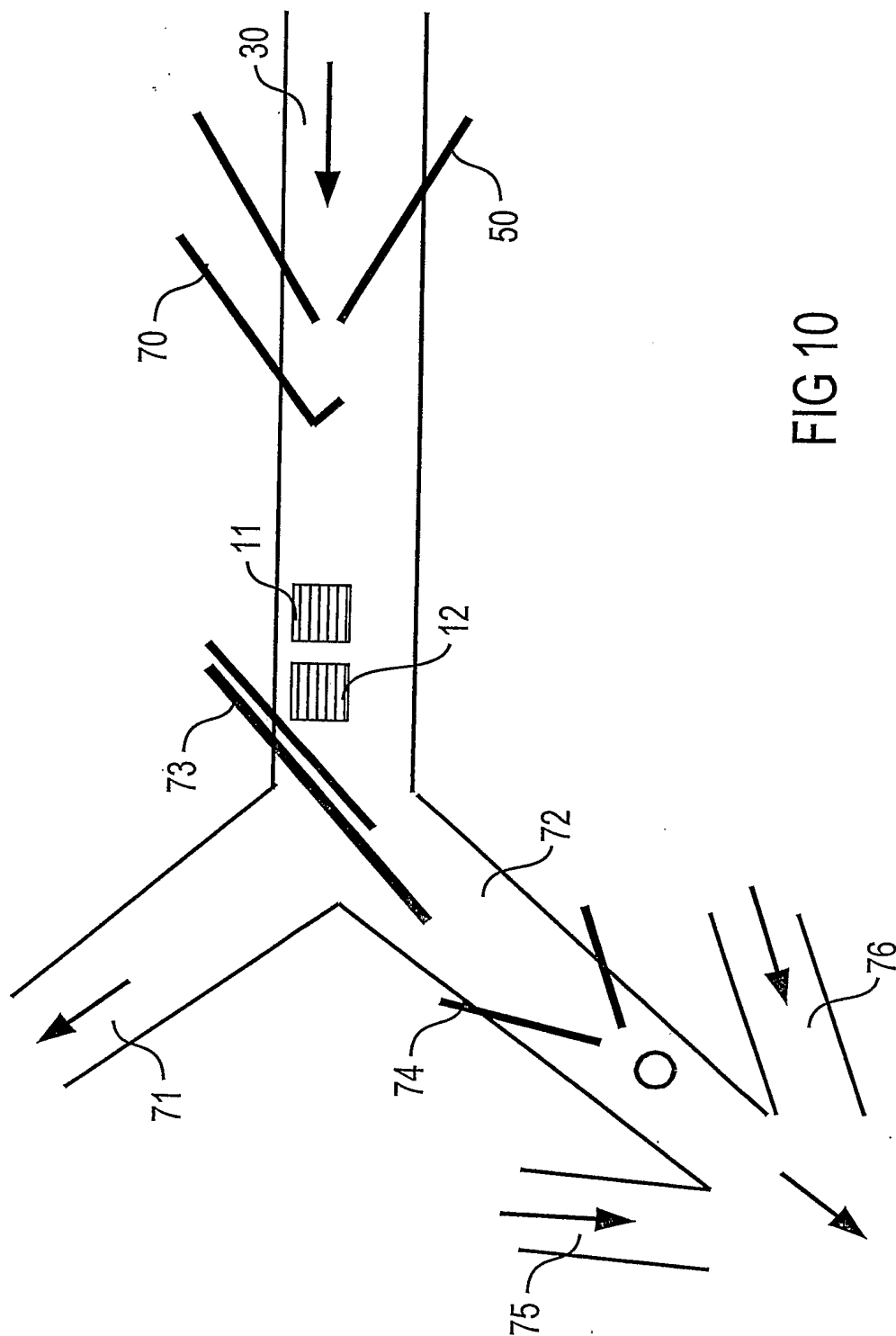
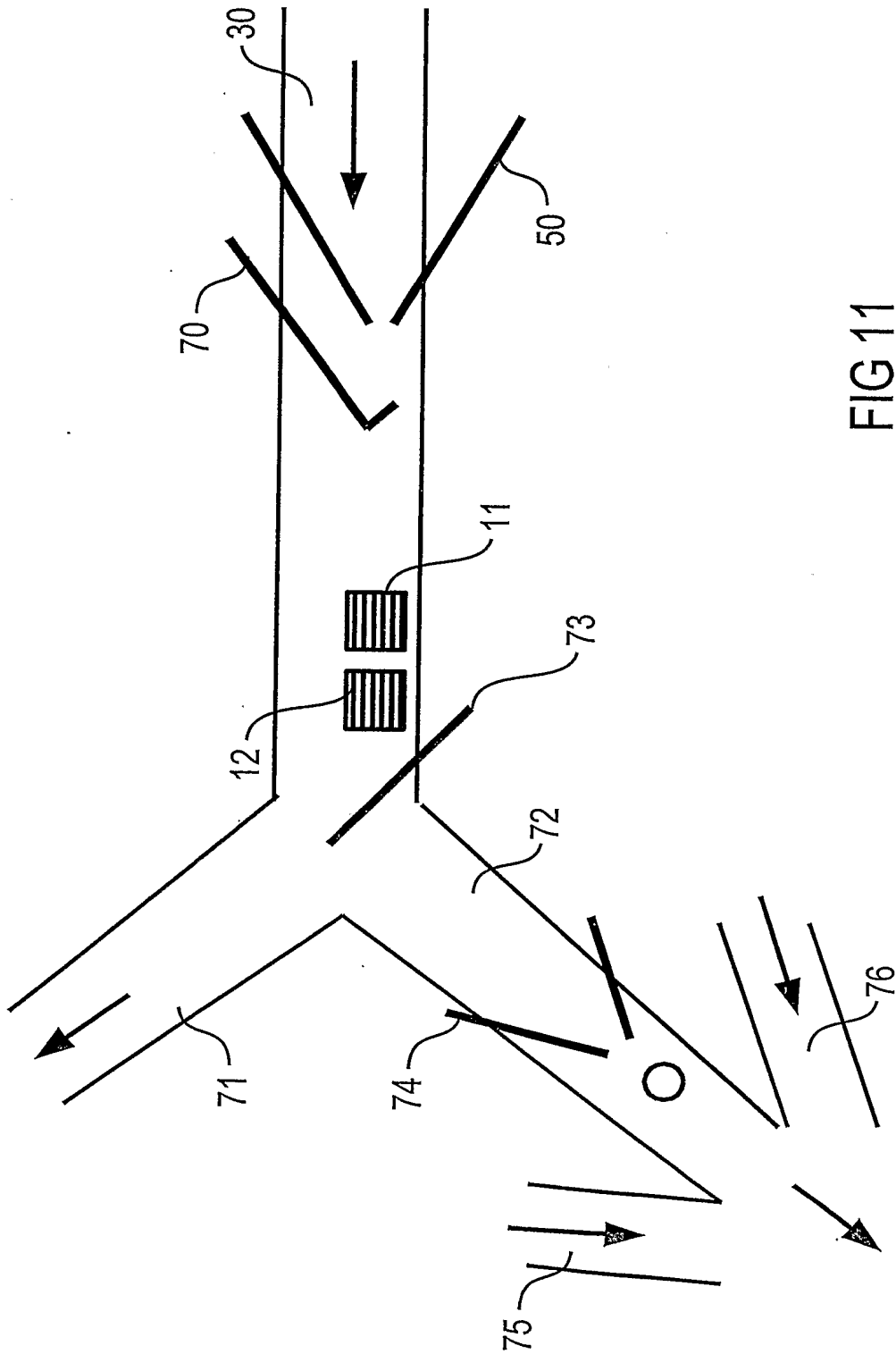


FIG 10



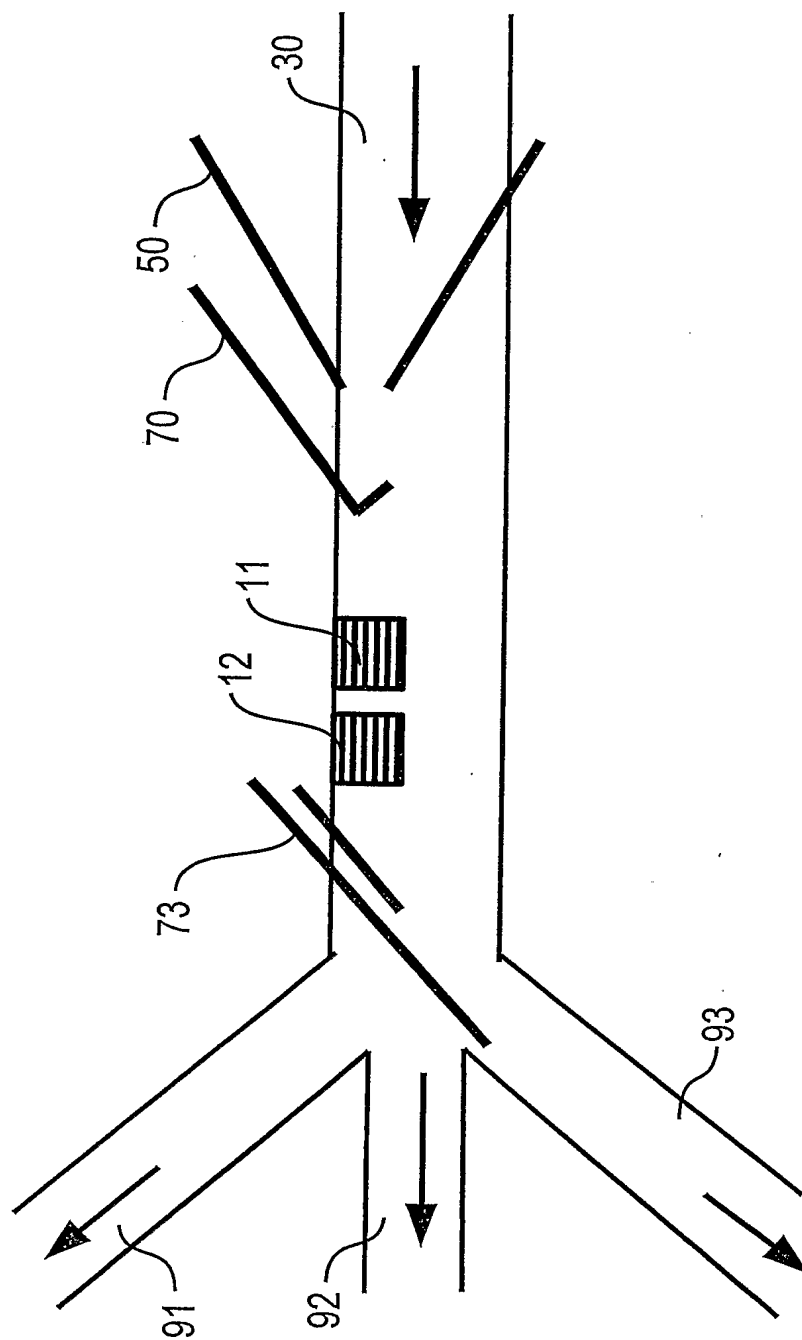


FIG 12

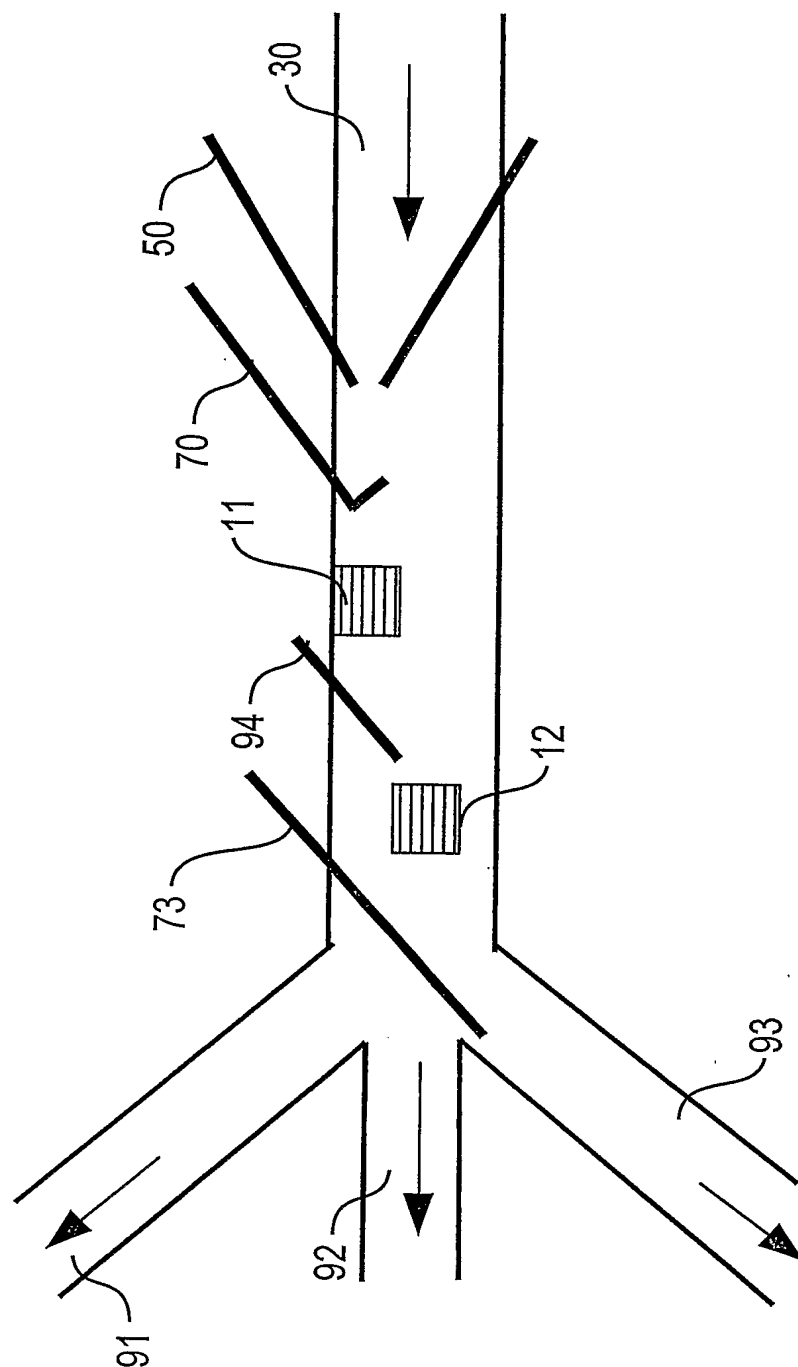


FIG 13